

mgr Anna Czajkowska-Mystek

Aminy biogenne w środkach spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego

Biogenic amines in foodstuffs intended for particular nutritional uses

Promotor pracy

dr hab. inż. Joanna Leszczyńska

STRESZCZENIE

Aminy biogenne są biologicznie aktywnymi, organicznymi związkami azotowymi, powstającymi głównie w procesie dekarboksylacji odpowiednich aminokwasów lub *in vivo* poprzez aminację lub transaminację aldehydów i ketonów. Aminy, są nieodzownym składnikiem żywych komórek roślin, zwierząt i ludzi, gdzie powstają w wyniku naturalnych procesów biochemicznych, zachodzących na poziomie komórkowym. Jednocześnie związki te mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka, w przypadku obecności w żywności w większych, toksycznych ilościach, występujących głównie w produktach poddanych procesowi fermentacji lub dojrzewania. Najczęściej, przyczyną zatruc pokarmowych jest spożycie z żywnością znacznej ilości histaminy (skombrotoksizm) i tyraminy (zespół reakcji na ser). Zatrucia aminami biogennymi są często klasyfikowane jako reakcje nietolerancji, zwane pseudoalergiami.

Do środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego zaliczana jest żywność dla zdrowych niemowląt i małych dzieci do lat 3, która dzięki swojemu specjalnemu składowi lub procesowi wytwórczemu wyraźnie odróżnia się od środków spożywczych przeznaczonych do normalnego spożycia. Gotowe przetwory dla niemowląt i małych dzieci ze względu na różnorodność i dostępność cieszą się bardzo dużą popularnością. Potencjalne niebezpieczeństwo dla niemowlęcia lub dziecka może wystąpić po spożyciu pokarmu zawierającego aminy biogenne już w niewielkiej ilości, które dodatkowo mogą aktywować uwalnianie histaminy z komórek tucznych i powodować proces na podłożu pseudoimmunologicznym.

Zawartość amin biogennych w żywności dla niemowląt i małych dzieci nie była dotychczas obiektem badań. Wynika to zarówno z braku metodyk umożliwiających ich oznaczenie z odpowiednią czułością, jak również z faktu, że niski poziom zawartości tych związków w żywności nie stanowi zagrożenia dla zdrowego dorosłego człowieka.

Celem pracy była ocena występowania amin biogennych w środkach spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego z wykorzystaniem opracowanych metod oznaczania: histaminy, tyraminy, putrescyny, kadaweryny, spermidyny i sperminy techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz histaminy testami immunoenzymatycznymi (ELISA). Badania zostały wykonane w 68 gotowych produktach dla niemowląt i małych dzieci takich jak zupki, obiadki oraz deserki owocowe, pochodzących od 10 producentów dostępnych na rynku handlowym i należących do grup przetworów: rybno-warzywnych, mięsno-warzywnych, warzywnych i owocowych. W badaniach skupiono się na analizie zawartości najbardziej toksycznych amin biogennych (histamina, tyramina), związkach mogących wpływać na zahamowanie działalności enzymów odpowiedzialnych za detoksykację histaminy, zwiększając tym samym jej toksyczne działanie (putrescyna, kadaweryna) oraz poliamin (spermidyna, spermina), ze względu na ich potencjalne właściwości kancerogenne.

W ramach realizacji pracy opracowano, zoptymalizowano i zwalidowano dwie metody chromatograficzne wykorzystujące wysokosprawną chromatografię cieczową z derywatyzacją przedkolumnową aldehydem *o*-ftalowym (OPA) w obecności 2-merkaptoetanolu (2-ME) z detekcją fluorymetryczną (RP-HPLC-FLD) oraz chlorkiem dansylu (Dns-Cl) z detekcją mas (RP-HPLC-APCI-MS). Uzyskanie stabilnych pochodnych OPA/2-ME z histaminą, kadaweryną, tyraminą i putrescyną umożliwiło ilościową analizę tych związków w przetworach dla niemowląt i małych dzieci z granicami oznaczalności na poziomie 26-36 ng/g. Zastosowanie spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową pozwoliło na oznaczenie zawartości putrescyny, kadaweryny, histaminy, tyraminy, spermidyny i sperminy w próbkach na nieosiągalnym dotychczas poziomie 2-50 ng/g. Dodatkowo, poddano adaptacji trzy komercyjnie dostępne testy immunoenzymatyczne oparte na bezpośredniej konkurencyjnej metodzie immunoenzymatycznej (CD-ELISA), umożliwiając wykonanie analiz zawartości histaminy w produktach dla niemowląt i małych dzieci z czułością 30 ng/g. Wyniki badań uzyskane testami ELISA skorelowano z wynikami analiz uzyskanymi metodą chromatograficzną (RP-HPLC-FLD z OPA/2-ME). Wykonano także analizę korelacji między wynikami badań próbek uzyskanymi za pomocą opracowanych metod chromatograficznych (RP-HPLC-FLD i RP-HPLC-APCI-MS).

Zastosowane spektrometru mas typu pojedynczy kwadrupol (MS) z jonizacją pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI), umożliwiło wykonanie fragmentacji powstałych jonów pseudomolekularnych w źródle jonów bez konieczności stosowania tandemowego spektrometru mas (MS/MS). Dzięki temu możliwe było potwierdzenie struktury dansylowych

pochodnych z aminami. Połączenie techniki separacyjnej (HPLC) ze spektrometrią mas (MS) pozwoliło również uzyskać profil amin biogennych występujących w produktach dla niemowląt i małych dzieci. W przetworach zidentyfikowano obecność amin biogennych takich jak: metyloamina, etyloamina, putrescyna, kadaweryna, histamina, agmatyna, serotonina, tyramina, spermidyna, norepinefryna, dopamina i spermina.

W analizowanych produktach oznaczono średnio 186 ng/g histaminy, 300 ng/g tyraminy, 5654 ng/g putrescyny, 90 ng/g kadaweryny, 4907 ng/g spermidyny i 1278 ng/g sperminy. Największą zawartość histaminy uzyskano w próbce przetworu warzywnego zawierającego szpinak, tyraminy w próbce deserku owocowego z bananem, putrescyny, kadaweryny i sperminy w próbce przetworu rybno-warzywnego zawierającego groszek oraz spermidyny w próbce przetworu warzywnego z groszkiem. Największą sumaryczną zawartość sześciu amin biogennych oznaczono w przetworach zawierających groszek lub banan. Nie wykazano zależności sumarycznej zawartości amin biogennych od producenta produktu, a większa ilość amin w niektórych przetworach wynikała z zastosowania konkretnych składników produktu. Analiza statystyczna wyników badań wykazała szereg istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ilością amin biogennych a składnikami przetworów oraz pomiędzy zawartością poszczególnych związków w próbkach.

Ocena zawartości amin biogennych umożliwiła wskazanie komponentów produktów dla niemowląt i małych dzieci, które należałoby wykluczyć ze stosowania (tuńczyk, ewentualnie szpinak) lub zmniejszyć ich zawartość w produkcie (szpinak, groszek) albo ograniczyć jego stosowanie u niemowląt poniżej 12 m-ca życia (wołowina). Należy także zwrócić szczególną uwagę na spożycie przez niemowlęta przetworów zawierających banan, ze względu na większą zawartość tyraminy i putrescyny w tych produktach, w porównaniu z pozostałymi deserkami owocowymi. Na podstawie wyników badań oszacowano %ARfD (potencjalna sugerowana maksymalna dawka jednorazowa) dla histaminy oraz wyznaczono wskaźnik potencjalnej toksyczności związanej ze spożyciem amin biogennych (BAI) produktów dla niemowląt i małych dzieci.

Uzyskane wyniki badań wskazują na potrzebę zwrócenia szczególnej uwagi na właściwy dobór komponentów żywności przeznaczonej dla najmłodszych konsumentów w celu ich ochrony przed niepożądanymi skutkami spożycia toksycznych amin.

SUMMARY

Biogenic amines are biologically active, nitrogenous organic compounds, mainly formed by decarboxylation process of the corresponding amino acids or *in vivo* by amination and transamination of aldehydes or ketones. Amines are essential components of all living organisms: plants, animals and humans, where can be formed through natural biochemical processes taking place at the cellular level. Nonetheless, amines may be hazardous to human health if their levels of foods reach a critical threshold, observed mainly in fermented and ripened food products. The most of food poisonings are caused by intoxications of histamine (scombrototoxicosis) and tyramine (known as cheese reaction). The food adverse reactions caused by amines are mainly classified as intolerance reactions, known as pseudo-allergies.

Foods intended for infants and young children are classified to foodstuffs intended for particular nutritional uses, owing to their special composition or manufacturing process, and are clearly distinguishable from foodstuffs for normal consumption. Ready-to-eat food preserves intended for infants and young children are very popular due to its commercial availability and diversity. Potential adverse reactions among infants and young children could appear after consumption of food containing small amounts of biogenic amines which may enhance histamine release from basophils and provoke allergy-like responses.

Foods for infants and young children have never been the object of biogenic amine profiling. The primary causes of this is due to the lack of properly analytical methodology with appropriate sensitivity and the secondary, that so low level of these compounds in food is not being hazardous for healthy adults.

The aim of this study was to evaluate of amine content in foodstuffs intended for particular nutritional uses using developed methods for analysis of biogenic amines: histamine, tyramine, putrescine, cadaverine, spermidine and spermine by high-performance liquid chromatography (HPLC), and histamine by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques. Analyses were performed in 68 ready-to-eat products e.g. soups, dinners, and fruit preserves intended for infants and young children, and produced by 10 available on market manufacturers, divided into fish-based, meat-based, vegetable-based and fruit-based preserves. The studies focused on presence in baby foods of direct toxic biogenic amines (histamine, tyramine) or with cancerogenic properties (spermidine, spermine), and for the presence of amines (putrescine, cadaverine) which enhance histamine toxicity by inhibiting histamine metabolising enzymes.

Two chromatographic methods based on high-performance liquid chromatography with pre-column derivatisation by *o*-phthaldialdehyde (OPA) with 2-mercaptoethanol (2-ME) using fluorescence detection (RP-HPLC-FLD), and by dansyl chloride (Dns-Cl) using mass spectrometry detection (RP-HPLC-APCI-MS) were developed, optimized and validated. The stable OPA/2-ME derivatives obtained for histamine, cadaverine, tyramine and putrescine enabled quantitative analysis of these compounds in foods for infants and young children on the level of 26-36 ng/g. Mass spectrometry detection coupled to an high-performance liquid chromatography system allowed to putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and spermine analysis in samples at previously undetectable concentration levels 2-50 ng/g. Additionally, three commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests for food using competitive direct enzyme-linked immunosorbent method (CD-ELISA) were adapted to quantify the histamine concentration in foods for infants and young children on sensitivity level of 30 ng/g. The ELISA test results were correlated against the chromatographic results (RP-HPLC-FLD by OPA/2-ME). The correlations between results of both chromatographic methods (RP-HPLC-FLD and RP-HPLC-APCI-MS) were also performed.

Using single quadrupole mass spectrometer with an atmospheric pressure chemical ionisation ion source (APCI) the in-source fragmentation of pseudomolecular ions to the product ion was also possible, without the need to undertake MS/MS analyses. Therefore, the confirmation of created dansyl-adducts was also accomplished. Connection of separation technique (HPLC) with mass spectrometry detection allowed to biogenic amine profiling of foods for infants and young children. The identified amines were methylamine, ethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, agmatine, serotonin, tyramine, spermidine, norepinephrine and spermine.

The average levels for histamine 186 ng/g, tyramine 300 ng/g, putrescine 5654 ng/g, cadaverine 90 ng/g, spermidine 4907 ng/g, and spermine 1278 ng/g were obtained. Maximum level for histamine content in vegetable sample with spinach, for tyramine in fruit preserve contain banana, for putrescine, cadaverine and spermine in fish-based vegetable preserve with green peas and spermidine in vegetable preserve with green peas were noted. The maximum total concentration of six amines in preserves contains green peas or bananas were assessed. In general, the amine content was independent of the manufacturer, rather by specific product components. Statistical analysis results indicated a number of important, significance correlations between biogenic amine content vs. preserve components and between the particular amine contents estimated in the samples.

Analysis of amine content in preserves intended for infants and young children indicated the presence of food ingredients which may be necessary to remove (tuna, possibly spinach) or reduce the amount added (spinach, green peas), either reduce its using for infants under 12 months of age (beef). Special attention is needed to control the consumption of fruit-based preserves containing banana by infants, due to higher tyramine and putrescine levels in these meals. On the basis of estimated results the %ARfD (Acute Reference Dose) values for histamine in foods for infants and young children and the BAI (Biogenic Amine Index) for potentially toxic assessment of preserves were also assessed.

Obtained results clearly indicate that there is the need to pay special attention on properly ingredients selection in foodstuffs intended for the youngest consumers in order to protect them from the adverse effects of the toxic amines consumption.